

**ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΚΑΙ ΤΗΝ  
ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΑΓΕΝΝΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΜΗ ΑΝΑΓΕΝΝΟΜΕΝΩΝ  
ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ ΚΑΠΝΟΥ (*Nicotiana tabacum*)**

**Παπαδάκη Αναστασία Πολυξένη**

*Εργασία για την απόκτηση μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης στην Φυσιολογία  
και Βιοχημεία Φυτών.*

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 1993

**A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Τα ανωτέρα φυτά είναι πολυκύτταροι οργανισμοί που αποτελούνται από ιστούς και όργανα, ειδικευμένα για συγκεκριμένες λειτουργίες. Τα φυτικά κύτταρα εμφανίζουν διαφορές στην δομή και τις μεταβολικές τους δραστηριότητες, ανάλογα με το όργανο που ανήκουν. Έτσι σε κάθε κυτταρικό τύπο εκφράζονται ειδικές ομάδες γονιδίων με ποσοτικές, ποιοτικές, χρονικές και τοπικές διαφοροποιήσεις, κατά την ανάπτυξη. Παρόλα αυτά και κάτω από ειδικές συνθήκες (πχ. τραυματισμός), η παραπάνω διαφοροποίηση είναι δυνατόν να τροποποιηθεί (Meyer et al, 1993). Η έκφραση της μοναδικής ιδιότητας των φυτικών κυττάρων, της αναγεννητικής ικανότητας (totipotency), είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη διαδικασία της αποδιαφοροποίησης (dedifferentiation), το φαινόμενο δηλαδή, όπου διαφοροποιημένα κύτταρα επανέρχονται στον κυτταρικό κύκλο περνώντας το περιοριστικό σημείο από την G<sub>0</sub> στη S φάση (Takahashi et al, 1989).

Η αναγεννητική ικανότητα χαρακτηρίζει την ικανότητα διαφοροποιημένων, μη διαιρούμενων σωματικών κυττάρων, όταν καλλιεργούνται κατάλληλα, να ξαναρχίζουν διαιρέσεις και να παράγουν κάλλους (μάζα από αδιαφοροποίητα κύτταρα), οι οποίοι, τελικά, μπορούν να αναγεννήσουν ολόκληρο φυτό, με άμεση οργανογένεση ή μέσω σωματικής εμβρυογένεσης (Siminis et al, 1993). Με άλλα λόγια, πρόκειται για την ιδιότητα που επιτρέπει στα φυτικά κύτταρα να αλλάζουν την κανονική γονιδιακή τους έκφραση, η οποία σχετίζεται με τον ιστό στον οποίο ανήκουν, και να γίνονται ικανά να εκφράζουν γονίδια ρύθμισης της μιτωτικής ενεργότητας (Roubelakis-Angelakis, 1993). Η βιοχημική και μοριακή βάση του

φαινομένου της αποδιαφοροποίησης παραμένει άγνωστη, ενώ λόγω της σύνδεσης του φαινομένου αυτού με την αναγεννητική ικανότητα των φυτών και τελικά με μία μοναδική ιδιότητα, χρήσιμη για την εφαρμογή της Βιοτεχνολογίας στη τροποποίηση και βελτίωση φυτικών ειδών, αποτελεί πεδίο αυξανόμενης ερευνητικής δραστηριότητας. Το καταλληλότερο σύστημα για την μελέτη του θεωρούνται οι πρωτοπλάστες μεσοφύλλου, οι οποίοι συνιστούν ένα ομοιογενή πληθυσμό, που προέρχεται από τον ίδιο ιστό και σε καλλιέργεια, ακολουθεί την ίδια πορεία ανάπτυξης (Meyer et al, 1993).

Ως πρωτοπλάστες χαρακτηρίζονται τα φυτικά κύτταρα χωρίς τα κυτταρικά τους τοιχώματα. Πρόκειται δηλαδή, για απομονωμένα, μονά και "γυμνά" φυτικά κύτταρα, μερικά από τα οποία έχουν την δυνατότητα να αναγεννήσουν το κυτταρικό τους τοίχωμα, να αποδιαφοροποιηθούν, να διαιρεθούν μιτωτικά, να σχηματίσουν κυτταρικούς κλώνους, και να διαφοροποιηθούν σε ριζικά και βλαστικά μεριστώματα (ή έμβρυα), που τελικά θα αναγεννήσουν ολόκληρο το φυτό. Έτσι σε κυτταρικό επίπεδο, οι πρωτοπλάστες είναι ικανά για αναγέννηση κύτταρα (Potrykus & Shillito, 1986). Απομονώθηκαν για πρώτη φορά με μηχανικές μεθόδους, όμως ο όγκος της βιβλιογραφικής πληροφορίας πάνω σε πρωτοπλάστες συνδέεται με την παροχή ενζύμων αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος (Cocking, 1961).

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των πρωτοπλαστών και των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας έδωσαν χρήσιμα εργαλεία στην Βιοτεχνολογία των Φυτών, η οποία στοχεύει στη βελτίωση των φυτικών ειδών, δημιουργώντας είδη με τροποποιημένους ή πρόσθετους επιθυμητούς χαρακτήρες. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι: i) Σωματική υβριδοποίηση μέσω σωματικής συνένωσης (fusion) πρωτοπλαστών. Η σωματική υβριδοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενδοειδικών υβριδίων που δεν μπορούν να υβριδιστούν παραδοσιακά, για την παραγωγή υβριδίων μεταξύ ειδών φυλετικά ασύμβατων ή εξελικτικά απομακρυσμένων και τέλος, για παραγωγή κυτοπλασμικών υβριδίων (cybrids). ii) Μεταλλαξογέννεση πρωτοπλαστών με χρήση διαφόρων μεταλλαξιγόνων οπότε επιτυγχάνεται παραγωγή συγκεκριμένων φαινοτύπων. iii) Μεταφορά οργανιδίων. iv) Μεταφορά γονιδίων (μέσω πλασμιδίων, DNA-ιών, "γυμνού" DNA)(Power et al, 1986). Με τους παραπάνω τρόπους έχει επιτευχθεί τροποποίηση σε είδη που χρησιμοποιούνται ως συστήματα - μοντέλα, πχ. πετούνια, καπνός αλλά όχι σε κύρια καλλιεργούμενα είδη, όπως σιτηρά, δημητριακά κ.τ.λ. (Puite, 1992). Ο κύριος στόχος

της Βιοτεχνολογίας είναι η βελτίωση των παραπάνω οικονομικών ειδών. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρήση της τεχνολογίας των πρωτοπλάστων στην φυτική βελτίωση είναι η παραγωγή βιώσιμων πρωτοπλάστων από αυτά τα είδη και η αναγέννηση φυτών από αυτούς.

Πρωτοπλάστες από τα σημαντικότερα φυτικά είδη δείχνουν ανικανότητα να αποδιαφοροποιηθούν και να εισέλθουν σε κυτταρικό κύκλο. Αυτό το φαινόμενο καλείται ανικανότητα αναγέννησης (recalcitrance) και είναι από τα κυριότερα πεδία έρευνας σήμερα αφού μόνο όταν ξεπεραστεί, θα υπάρχει δυνατότητα για εφαρμογή των παραπάνω σε πρακτικό επίπεδο. Η επιτυχής αναπτυξιακή αλληλουχία από τον πρωτοπλάστη στο φυτό, εξαρτάται από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες, που περιλαμβάνουν την προσωπική ιστορία του φυτού-δότη και την διαδικασία της απομόνωσης και ακόμα, σε μοριακό επίπεδο την ενεργοποίηση ή όχι συγκεκριμένων γονιδίων και μηχανισμών.

Ξεκινώντας από το φυτό-δότη πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν είδη (ή ακόμα γένη και οικογένειες) όπως *Nicotiana tabacum* (*Nicotiana*, *Solanaceae*) τα οποία εύκολα μπορούν να αναγεννηθούν από πρωτοπλάστες (Binding, 1975, Nagata & Taguebe, 1971), ενώ αντίθετα υπάρχουν οικογένειες όπως τα *Gramineae*, οι οποίες παραμένουν σταθερά ανίκανες για αναγέννηση (Jung & Wernicke, 1993, Loudon et al, 1989, Ochatt 1991). Εκτός όμως από αυτές τις δύο ακραίες καταστάσεις, έχει παρατηρηθεί διαφορετική ανταπόκριση μεταξύ γονοτύπων του ίδιου είδους. Γενετικά στοιχεία γι' αυτό το φαινόμενο δεν υπάρχουν.

Οι αντιμαχόμενες απόψεις όσον αφορά την αναγεννητική ικανότητα των πρωτοπλάστων είναι η θεώρηση ότι δεν είναι όλα τα φυτικά κύτταρα σε θέση να αναγεννηθούν αλλά υπάρχουν "ικανά" κύτταρα τα οποία διαθέτουν αυτορυθμιζόμενο προγραμματισμό για αποδιαφοροποίηση, μιτωτική διαίρεση και διαφοροποίηση (Potrykus & Shillito, 1986) και κύτταρα τα οποία έχουν ειδικευτεί τόσο πολύ κατά την εξέλιξη, ώστε να φέρουν πάντα τις διαφοροποιημένες λειτουργίες τους, οι οποίες εμποδίζουν την έκφραση του μορφογενετικού δυναμικού τους (Thomas et al, 1979). Το έναυσμα για την έναρξη του προγράμματος των "ικανών" κυττάρων δίνεται από τον τραυματισμό (wound response), ξεκινά κατά την απομόνωση και ενισχύεται από τις ορμονικές μεταχειρίσεις (Meyer, 1992, Potrykus & Shillito, 1986). Εναλλακτικά, υποστηρίζεται ότι όλα τα ζωντανά κύτταρα είναι δυνητικά ικανά να σχηματίσουν ένα ολοκληρωμένο οργανισμό ή με άλλα λόγια δεν υπάρχει κληρονομική ανικανότητα

για αποδιαφοροποίηση και επανείσοδο σε κυτταρικό κύκλο (Hahne, 1989), αλλά δεν υπάρχουν ακόμα δεδομένα για τον τρόπο με τον οποίο επιτρέπεται η αυτοέκφραση αυτής της ιδιότητας. Στην πραγματικότητα, τα προβλήματα που αντιμετωπίζονται είναι μάλλον αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης όλων των προηγούμενων παραγόντων που αναφέρθηκαν.

Ένα από τα βασικότερα σημεία της αναγεννητικής ικανότητας είναι όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αποδιαφοροποίηση των κυττάρων, η μετάβαση δηλαδή από την G<sub>0</sub> στην S φάση (διπλασιασμός χρωμοσωμάτων). Προκειμένου να κατανοηθεί αυτή η μετάθεση είναι απαραίτητη η γνώση της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου στα φυτά και η κατανόηση της "πληροφορίας", που καθορίζει την ετοιμότητα του κυττάρου για την είσοδο στην φάση S ή M (μίτωση), "πληροφορία" η οποία συσσωρεύεται κατά τις ενδιάμεσες φάσεις G<sub>1</sub>(μεταξύ M ή S ) και G<sub>2</sub>(μεταξύ S και M), αντίστοιχα.

Η μετάβαση από την G<sub>2</sub>/M φάση εξαρτάται από μια πρωτεϊνική κινάση η οποία είναι υψηλά συντηρημένη σε δομή ή λειτουργία σ' όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Norbury & Nurse, 1992). Περιγράφηκε αρχικά στα αμφίβια ως Maturation ή Mitosis Promoting Factor, MPF (Smith, 1971). Σήμερα είναι γνωστό ότι ο MPF είναι πρωτεΐνη, υπεύθυνη για την επαγωγή της M φάσης και ότι αποτελεί ένα ετεροδιμερές από τις ακόλουθες δύο υπομονάδες : η πρώτη είναι η p34cdc2, μία σερίνη/θρεονίνη πρωτεϊνική κινάση που έχει ρόλο καταλυτικής υπομονάδας (Jacobs, 1992).

Στους ανώτερους οργανισμούς η p34cdc2 έχει σημασία για την μετάβαση από G<sub>2</sub>/M ενώ στους μύκητες ο πιθανότερος ρόλος της είναι ξεπέρασμα του START σημείου, του ορίου δηλ. G<sub>1</sub>/S. Το δεύτερο συστατικό του MPF είναι μία B-τύπου κυκλίνη (Jacobs, 1992). Λειτουργικές B κυκλίνες απαιτούνται για την είσοδο στην M φάση αφού η σύνδεση τους με το p34cdc2 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του τελευταίου (Draetta & Beach, 1988), ενώ η απενεργοποίηση του στο τέλος της M φάσης επιτυγχάνεται με την παρουσία ανενεργής p34cdc2, μετά την πρωτεολυτική διάσπαση της B-κυκλίνης. Οι κυκλίνες φέρουν χαρακτηριστικές αλληλουχίες όπως το cyclin box. Έχουν κλωνοποιηθεί σε μία σειρά οργανισμών και ανάλογα με την αλληλουχία τους διακρίνονται σε διάφορους τύπους όπως A-, B-, CLN- τύπου κυκλίνες (Lew & Read, 1992).

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται ως εξής: νωρίς κατά τον κυτταρικό κύκλο συσσωρεύεται ποσότητα ανενεργού συμπλόκου p34cdc2 κυκλίνης

B, η ενεργοποίηση του οποίου πραγματοποιείται με αλλαγή στο επίπεδο φωσφορυλίωσης του p34cdc2. Οι θέσεις φωσφορυλίωσης του p34cdc2 ποικίλουν από δύο μέχρι τέσσερις (Jacobs, 1992), ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Στις ζύμες υπάρχουν δύο, η Tyr 15 και η Thr 16 (Norbury & Nurse, 1992, Could & Nurse, 1989). Για να υπάρξει είσοδος στην M φάση, απαιτείται αποφωσφορυλίωση της Tyr 15, αφού έτσι επιτρέπεται η δράση της κινάσης από άμεση δέσμευση του ATP (η Tyr 15 βρίσκεται στην περιοχή δέσμευσης του ATP και η φωσφορυλίωση του, την εμποδίζει). Η αποφωσφορυλίωση της Tyr 15 (ή της Thr 16) πραγματοποιείται από το προϊόν του γονιδίου cdc25 (p80cdc25) που είναι μία πρωτεϊνική φωσφατάση (Millar and Russe, 1986). Από τη στιγμή που υπάρχει έστω μικρή ποσότητα ενεργού MPF, ενεργοποιείται μηχανισμούς θετικής αυτορύθμισης, που επιτρέπει την παραγωγή ολοένα και αυξανόμενης ποσότητας ενεργού MPF.

Ως πρωτεϊνική κινάση, ο MPF δρά τόσο σε δομικά συστατικά όσο και βοηθητικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αναδιοργάνωση του κυττάρου κατά την μίτωση (πυρηνικές λαμίνες, βιμεντίνη, ιστόνη Η κτλ.)(Norbury & Nurse, 1986). Δηλαδή ως κύρια λειτουργία του θεωρείται η επίδραση στις ενδοκυττάρια αλλαγές κατά την G2/M μετάβαση. Στο τέλος της M φάσης η απενεργοποίηση του MPF πραγματοποιείται από το p13 (αναστολέας της p34cdc2 κατά της G2 φάση) (Draetta et al., 1989, Moreno et al, 1989).

Ο ρόλος του MPF για την G2/M μετάβαση είναι πλήρως καθορισμένος. Αυτό που παραμένει άγνωστο είναι ποιός ή ποιοι παράγοντες δρουν για την G1/S μετάβαση. Απαραίτητη προϋπόθεση για την είσοδο στην S φάση είναι η παρουσία αυξητικών παραγόντων και ενεργού πρωτεϊνοσύνθεσης, ενώ το γονιδιακό προϊόν cdc2, έχει μάλλον κάποιο ρόλο αλλά με διαφορετικής δομής, αλληλεπιδράσεις ή λειτουργίες (Norbury & Nurse, 1992).

Πρόσφατη ερευνητική δουλειά στα φυτά έχει δείξει ότι ο βασικός μηχανισμός ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου είναι πανοργανισμικά συντηρημένος (Jacobs, 1990, Inze' et al, 1992). Όπως και άλλοι οργανισμοί, τα φυτά φέρουν γονίδια cdc2 (Ferreira et al, 1991), κυκλινών (Hemerly et al, 1992), φωσφατασών (Nitschke et al, 1992), cdc25, αλλά η αναπτυξιακή τους ρύθμιση είναι ελάχιστα γνωστή. Η ανάλυση της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων, σε συνδυασμό με την δράση αυξητικών ρυθμιστικών παραγόντων και στοιχείων των μηχανισμών μετάδοσης μηνυμάτων, θα επιτρέψει την ταυτοποίηση του τρόπου δράσεως των συστατικών του κυτταρικού

κύκλου και τελικά τον κατάλληλο χειρισμό αυτών (π.χ μεταλλάξεις), ώστε να επιτευχθεί η υπέρβαση των προβλημάτων σχετικών με ανικανότητα των κυττάρων να αποδιαφοροποιηθούν και να διαιρεθούν.

Μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί κανένα γονίδιο σχετικό με μίτωση, που να εκφράζεται στους πρωτοπλάστες. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι γονίδια, που ελέγχουν την μίτωση ή κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες απαραίτητες για μίτωση (πολυμεράσες, ιστόνες κ.τ.λ.), πρέπει να εκφράζονται στους πρωτοπλάστες κατά τον κυτταρικό κύκλο. Επειδή όμως ο χρόνος της πρώτης διαίρεσης, που σχετίζεται με την αποδιαφοροποίηση, διαρκεί πολύ χρόνο (για πρωτοπλάστες από μεσόφυλλο *Nicotiana tabacum*, η πρώτη διαίρεση των περισσότερων λαμβάνει χώρα την 4η-5η μέρα καλλιέργειας) σε σχέση με την 20-24 ώρες διάρκεια του κυτταρικού κύκλου των μεριστωματικών ή καλλιεργούμενων κυττάρων, φαίνεται ότι ένας μικρός αριθμός mRNAs που κωδικοποιούν μιτωτικές πρωτεΐνες, είναι ικανοποιητικός αλλά όχι ανιχνεύσιμος (Meyer et al, 1993). Ακόμα ούτε το *ragA*-εξαρτούμενο από αυξίνη γονιδιακό προϊόν (Takahashi & Nagata, 1992), φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με μίτωση, αφού η επαγωγή του συνδέεται μεν χρονικά με την επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης (αρχή καλλιέργειας), όμως η δομή του και η μέχρι τώρα έρευνα για την λειτουργία του δεν προσφέρουν πληροφορίες για την άμεση συσχέτισή του με την μιτωτική δραστηριότητα (Meyer et al, 1993). Λόγω όμως της πλειοτροπικής δράσης της, η αυξίνη μπορεί να εμπλακεί σε πολλά φαινόμενα που συνδέονται με την πορεία των πρωτοπλαστών σε καλλιέργεια (πχ. ανασύσταση κυτταρικού τοιχώματος).

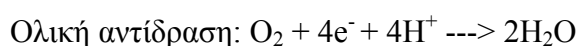
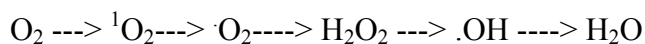
Η αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση, η οποία είναι αίτιο/προϊόν της αποδιαφοροποίησης των πρωτοπλαστών, αναφέρεται σε ένα πλήθος γονιδίων. Για παράδειγμα τα πυρηνικά γονίδια που συνδέονται με την φωτοσύνθεση, υφίστανται οξεία καταστολή ενώ χλωροπλαστικά mRNAs συνεχίζουν να εκφράζονται σε υψηλό ποσοστό τουλάχιστον τις δύο πρώτες μέρες της καλλιέργειας (Lett et al., 1980, Criqui et al., 1992). Παρατηρείται επίσης επαγωγή γονιδίων σχετικών με παθογένεση (Pathogenesis-related genes), εξτενσινών, περοξειδασών κ.τ.λ., γονιδίων δηλαδή που παράγουν βασικά κυτταρικά συστατικά και τα οποία επάγονται από τον τραυματισμό, την διαδικασία απομόνωσης, την οσμωτική πίεση του μέσου ή την ενζυμική αποδόμηση (Grosset et al., 1990, Fleck et al., 1992). Επαγωγή γονιδίων, σχετικών με αποδιαφοροποίηση, δεν είναι γνωστή.

Με τις σημερινές γνώσεις πάνω στην γονιδιακή έκφραση των πρωτοπλαστών μεσοφύλλου, μπορεί να ειπωθεί ότι γονίδια σχετικά με την άμυνα και τον πολλαπλασιασμό εκφράζονται νωρίς και συνεχίζουν να εκφράζονται στους *in vitro* κάλλους, τουλάχιστον για τους αναγεννώμενους πρωτοπλάστες, στους οποίους έχει βρεθεί ενεργή σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών (Grosset et al, 1990). Στους μη ικανούς για αναγέννηση πρωτοπλάστες υπάρχει σύνθεση DNA αλλά αυτοί είναι ανίκανοι να προχωρήσουν σε μίτωση (M φάση) (Katsirdakis, 1991, Wang et al., 1989). Έχει προταθεί ότι αυτή η ανικανότητα συνδέεται με αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση η οποία ρυθμίζεται από ποιοτικές και ποσοτικές αλλαγές στο DNA. Μία τέτοια ποιοτική αλλαγή, η οποία μπορεί να εμπλέκεται στην ρύθμιση της μεταγραφής και της διαφοροποίησης, είναι η μεθυλίωση του DNA (Herburn, 1987), αλλά συγκριτικά στοιχεία για ένα τέτοιο φαινόμενο μεταξύ αναγεννώμενων και μη πρωτοπλαστών δεν υπάρχουν.

Η ανικανότητα προς διαίρεση μπορεί να οφείλεται σε απλούστερα προβλήματα όπως πχ. στην λειτουργικότητα της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία είναι δυνατόν να χάσει την ακεραιότητα και την λειτουργικότητά της κατά την διαδικασία της απομόνωσης ή ακόμα και από την παρουσία ελεύθερων ριζών. Συγκριτικές μελέτες σε αναγεννώμενους (*Nicotiana tabacum*) και μη (*Vitis Vinifera*) πρωτοπλάστες, ως προς τα χαρακτηριστικά πρόσληψης σακχάρων και αμινοξέων έδειξαν ότι η λειτουργικότητα της μεμβράνης δεν επηρεάζεται από την απομόνωση και ότι κάτι τέτοιο δεν μπορεί να συσχετιστεί με αναγεννητική ή όχι ικανότητα των πρωτοπλαστών (Theodoropoulos & Roubelakis-Angelakis, 1989, 1991), ικανότητα η οποία δεν μπορεί να συσχετιστεί επίσης με την ανασύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και την λειτουργικότητα του κυτταροσκελετού αφού ανάλογες μελέτες δεν εμφάνισαν διαφορές στους δύο πληθυσμούς των πρωτοπλαστών (Katsirdakis et al, 1992).

Ένας άλλος παράγοντας που ίσως εμπλέκεται στην έλλειψη αναγεννητικής ικανότητας των πρωτοπλαστών, είναι το οξειδωτικό στρες (oxidative stress). Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι κατά την διάρκεια της απομόνωσης οι πρωτοπλάστες υφίστανται διάφορες καταστάσεις πίεσης και διάφορες αντιδράσεις επαγόμενες από το πλήγωμα, λαμβάνουν χώρα. Έτσι η πιθανότητα παρεκτροπής από τις κανονικές συνθήκες μεταβολισμού του οξυγόνου ή και απομάκρυνσης των καταστροφικών για το κύτταρο ελεύθερων ριζών, είναι μεγάλη και ίσως εξαιρετικά κρίσιμη για την

θνησιμότητα και διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλαστών (Roubelakis-Angelakis, 1993). Η τοξικότητα του οξυγόνου είναι γεγονός για την αερόβια ζωή γιατί παρά την αναγκαιότητα του για την υποστήριξη της ίδιας της ζωής, μπορεί να προκαλεί και θανατηφόρες καταστροφές. Στην μοριακή του μορφή (O<sub>2</sub>) είναι ανενεργό, όμως κατά την χρήση του μπορεί να υπάρξει ανεξέλεγκτη παραγωγή ενεργών ενδιάμεσων (Eistner, 1982), όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικ. Α1).



O<sub>2</sub> : μοριακό οξυγόνο (dioxygen)

<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: ενεργό οξυγόνο (singlet oxygen)

O<sub>2</sub><sup>·-</sup> : σουπεροξειδικό ανιόν (superoxide)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : υπεροξείδιο του υδρογόνου (hydrogen peroxide)

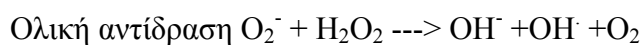
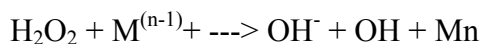
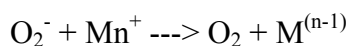
OH· : υδροξυλική ρίζα (hydroxyl radical)

H<sub>2</sub>O : νερό

Εικ. Α1: Η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε H<sub>2</sub>O, οδηγεί στον σχηματισμό διαφόρων ενεργών ενδιάμεσων, με συνεχή μεταφορά ηλεκτρονίων (Scandalios, 1993).

Τα προηγούμενα παράγωγα μπορούν να σχηματιστούν στο κύτταρο από κανονικές κυτταρικές αντιδράσεις. Γενικά, το υπεροξείδιο παράγεται κατά την μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, κατά την μεταφορά ηλεκτρονίων, κατά την φωτοσύνθεση (μέσα στους χλωροπλάστες) (Eistner 1982) και ως παραπροϊόν δράσης ενζύμων (xanthine oxidase, aldehyde oxidase, flavin dehydrogenases) (Fridovich, 1986). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι παράγωγο της αντίδρασης δύο σουπεροξειδικών ανιόντων, αλλά παράγεται και κατά την β-οξείδωση των λιπαρών οξέων (στα μικροσώματα) και την φωτοαναπνοή (στα περοξυσώματα). Το σουπεροξειδικό ανιόν και το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορούν να αντιδράσουν (Haber-Weiss reaction, Εικ. Α2) και να παράγουν υδροξυλική ρίζα (OH·) που θεωρείται το πιο ενεργό οξειδωτικό. Βέβαια, οι ενεργές μορφές του οξυγόνου μπορούν να δημιουργηθούν και κατά την έκθεση του κυττάρου σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως UV-φως, παρασιτοκτόνα (paraquat, diquat), παθογόνα, ατμοσφαιρικές μολύνσεις (όζον), διαταραχές θερμοκρασίας και υγρασίας (Bowler et al, 1992).



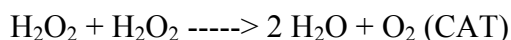
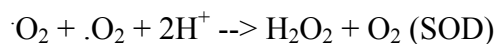
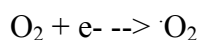


Εικ.Α2: Η αντίδραση Haber-Weiss (Elstner, 1982).

Οι στόχοι των ενεργών ελεύθερων ριζών του οξυγόνου (κυρίως της υδροξυλικής ρίζας), είναι τα λιπίδια (υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων των μεμβρανών), οι πρωτεΐνες (αποικοδόμηση ενζύμων), οι υδατάνθρακες (διάσπαση πολυσακχαριτών), τα νουκλεϊκά οξέα (αποχωρισμός των ελίκων, σπασίματα σε χρωμάτισες, μεταλλαγές). Το τελικό αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι ο κυτταρικός θάνατος (Fridovich, 1986).

Για την αντιμετώπιση των καταστροφικών αυτών αποτελεσμάτων τα αερόβια κύτταρα έχουν αναπτύξει διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς, ενζυμικούς και όχι. Στους τελευταίους περιλαμβάνονται διάφορα μικρά μόρια όπως η γλουταθιόνη (GSH), η κυστεΐνη, οι υδροξυκινόνες, η μαννιτόλη, οι βιταμίνες C και E, τα φλαβονοειδή, κάποια αλκαλοειδή και το β καροτίνιο (Larson, 1988). Η ενζυμική αντιοξειδωτική άμυνα περιλαμβάνει ένζυμα ικανά να μετακινήσουν, να εξουδετερώσουν και να αποβάλλουν τις ελεύθερες ρίζες και τα ενδιάμεσα του οξυγόνου. Χωρίς αυτούς τους αμυντικούς μηχανισμούς τα φυτά δεν θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν την ηλιακή ενέργεια και να την μετατρέψουν σε χημική (Scandalios, 1993).

Στα αντιοξειδωτικά ένζυμα ανήκουν είναι η ρεδοκτάση της γλουταθιόνης και η ασκορβική περοξειδάση, οι οποίες αποβάλλουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από τα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, αντίστοιχα, οι καταλάσες (CATs) και οι περοξειδάσες, που απομακρύνουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Scandalios, 1993) και οι σουπεροξειδικές δισμουτάσες (superoxide dismutase, SOD), που αποβάλλουν το σουπεροξειδικό ανιόν (Fridovich, 1973). Οι CATs και οι SODs είναι τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα και η συνδυασμένη δράση τους οδηγεί στην αποφυγή της Haber-Weiss αντίδρασης (λόγω έλλειψης των υποστρωμάτων της) ή με άλλα λόγια στην παραγωγή υδροξυλικής ρίζας (την πιο ενεργή και καταστροφική ρίζα). Οι αντιδράσεις στις οποίες μετέχουν παρουσιάζονται στην Εικ. Α3



Εικ. Α3: Αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οι SOD και CAT.

Αν πραγματικά ισχύει η συσχέτιση της μη αναγεννητικής ικανότητας των πρωτοπλαστών με το οξειδωτικό στρες, τότε κάποια από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, που αναφέρθηκαν θα παρουσίαζαν διαφορές τόσο σε ενεργότητα όσο και σε ισοενζυμικά προφίλ, σε μία συγκριτική μελέτη μεταξύ αναγεννώμενων και μη πρωτοπλαστών. Σε μία τέτοια ερευνητική εργασία μεταξύ αναγεννώμενων πρωτοπλαστών *Nicotiana tabacum* και μη αναγεννώμενων *Vitis vinifera* L, βρέθηκε αυξημένη ενεργότητα περοξειδάσης (πάνω από 12 φορές) στους πρώτους, μετά από 8 μέρες καλλιέργειας, καθώς και σημαντικές διαφορές στα ισοενζυμικά πρότυπα, όπου η έκφραση των βασικών ισοπεροξειδάσων στους πρωτοπλάστες καπνού (και όχι αμπελιού), συνδυάστηκε με ικανότητα υπαρξης κυτταρικής διαίρεσης. Διαφορές στα ισοενζυμικά πρότυπα έχουν παρατηρηθεί και στην κατάσταση των δύο πληθυσμών πρωτοπλαστών, που αναφέρθηκαν (Siminis et al, 1990, 1992, 1993).

Ένας άλλος δείκτης οξειδωτικού στρες και ίσως ο σημαντικότερος, είναι οι σουπεροξειδικές δισμουτάσες (SOD), οι οποίες υπάρχουν σ' όλους τους αερόβιους οργανισμούς, με ελάχιστες εξαιρέσεις. Πρόκειται για μεταλοπρωτεΐνες με μεγάλη ικανότητα στην αποβολή της σουπεροξειδικής ρίζας. Ανάλογα με το περιεχόμενο μέταλλο διακρίνονται σε χαλκό-ψευδάργυρο-SODs (Cu/ZnSODs), μαγγάνιο-SODs (MnSODs) και σίδηρο-SODs (FeSODs) (Elstner, 1982). Οι Cu/Zn SODs, όπως και οι περισσότερες προκαρυωτικές MnSODs και FeSODs, είναι διμερείς, ενώ οι μιτοχονδριακές και διάφορες βακτηριακές MnSODs είναι τετραμερείς.

Πειραματικά, μεταξύ τους διακρίνονται από την ευαισθησία/ ανθεκτικότητα σε  $\text{H}_2\text{O}_2$  και KCN: οι Cu/ZnSODs παρουσιάζουν ευαισθησία και στους δύο αναστολείς, οι MnSODs ανθεκτικότητα, ενώ οι FeSODs δείχνουν ευαισθησία στο  $\text{H}_2\text{O}_2$  και ανθεκτικότητα στο KCN (Inze', 1989). Φυλογενετικά, οι τρεις κλάσεις της SOD πρέπει να προήλθαν από δύο εξελικτικές οικογένειες. Οι MnSODs και οι Fe SODs παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομολογίας μεταξύ τους όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία και είναι, μάλλον, άσχετες δομικά με τις Cu/ZnSODs. Από την άλλη, οι περισσότεροι προκαρυωτικοί οργανισμοί που έχουν εξεταστεί, εμφανίζουν MnSODs

και FeSODs και όχι Cu/ZnSODs, όπως επίσης τα ευκαρυωτικά φύκη και τα πρωτόζωα. Αντίθετα οι τελευταίες υπάρχουν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και το ίδιο συμβαίνει για τις MnSODs: ενώ οι Cu/ZnSODs είναι συνήθως κυτοπλασματικές, οι MnSODs βρίσκονται στα μιτοχόνδρια. Έτσι η φυλογενετική κατανομή τοποθετεί τις MnSODs και FeSODs ως αρχαιότερες. Υπάρχει πιθανότητα η εξέλιξη τους να είχε πραγματοποιηθεί πριν το διαχωρισμό προκαρυωτικών/ ευκαρυωτικών οργανισμών ενώ οι Cu/Zn SODs εξελίχθηκαν ανεξάρτητα, κοντά στην έναρξη της ευκαρυωτικής γενεαλογίας. Με άλλα λόγια, το ίδιο ένζυμο εξελίχτηκε δύο φορές ως απόκριση στην ίδια περιβαλλοντική πίεση (Bowler et al, 1992, Scandalios, 1993).

Όσον αφορά την υποκυτταρική τοπολογία τους (η οποία έχει μελετηθεί σε πολλά φυτικά είδη), έχει βρεθεί ότι, γενικά οι Cu/ZnSODs βρίσκονται στο κυτόπλασμα και στο χλωροπλαστικό στρώμα, οι MnSODs είναι μιτοχονδριακές (εδράζουν στη μιτοχονδριακή μήτρα) και οι FeSODs, όπου υπάρχουν, είναι μάλλον χλωροπλαστικές. Επίσης, μία διμερής Cu/ZnSOD έχει απομονωθεί από γλυοξυσώματα (Bueno et al, 1992), ενώ καμιά εξωκυτταρική SOD δεν έχει ανιχνευτεί.

Στα φυτά υπάρχουν πολλαπλές ενζυμικές μορφές (ισοένζυμα) της SOD, η παρουσία των οποίων ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στο καλαμπόκι (Baum & Scandalios, 1982). Φαίνεται ότι οι μορφές αυτές αντιστοιχούν σε πολλαπλά, ασύνδετα πυρηνικά γονίδια έτσι ώστε οι διάφορες ισομορφές της SOD να εξυπηρετούν, ανάλογα με την τοπολογία τους και τις αλλαγές τους κατά την ανάπτυξη ή κατά την απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, ποικίλους μεταβολικούς όρους.

Ο αμυντικός ρόλος της SOD έχει ταυτοποιηθεί σε διάφορες περιπτώσεις περιβαλλοντικών πιέσεων. Έτσι αυξημένη ενεργότητα παρατηρείται μετά από επιδράσεις παρασιτοκτόνων (πχ. paraquat), διαταραχές θερμοκρασίας και φωτισμού, παρουσία όζοντος, διοξειδίου του θείου και αιθυλενίου, επιδράσεις παθογόνων και ανοξίας (Bowler et al, 1992, Monk et al, 1989, Scandalios, 1993). Σε κάθε μία από αυτές τις περιπτώσεις υπάρχει επαγωγή διαφορετικών ισοενζύμων (Baum et al, 1983, Matters & Scandalios, 1987, Tsang et al, 1991 ).

Συγκριτική μελέτη για την ενεργότητα της SOD σε αναγεννώμενους (*Nicotiana tabacum*) και μη (*Vitis vinifera*) πρωτοπλάστες, έδειξε αυξημένη

ενεργότητα στους δεύτερους κατά την διάρκεια της καλλιέργειας, πράγμα που σημαίνει παρουσία οξειδωτικού στρες (Siminis & Roubelakis-Angelakis, manuscript preparation). Η παρούσα εργασία αποσκοπεί σε μία συγκριτική μελέτη διαιρούμενων και μη πρωτοπλαστών καπνού (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi), όσον αφορά τις de novo συντιθέμενες πρωτεΐνες και το οξειδωτικό στρες (μέσω της SOD), κατά την διάρκεια της καλλιέργειας τους. Οι διαφορετικοί πληθυσμοί πρωτοπλαστών προκύπτουν μεταβάλλοντας την διάρκεια της ενζυμικής επίδρασης για την αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Siminis et al., 1993): 4h ενζυμικής δράσης παράγουν βιώσιμους και διαιρούμενους πρωτοπλάστες ενώ 16h οδηγούν σε πρωτοπλάστες με χαμηλότερη βιωσιμότητα και πολύ χαμηλή διαιρετική ικανότητα. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιείται ως αρχικό σύστημα μελέτης, με σκοπό τη μεταφορά της έρευνας στο αμπέλι, το οποίο ανήκει στα κλασσικά μη αναγεννώμενα είδη. Η σύγκριση των de novo συντιθέμενων πρωτεϊνών σκοπό έχει να παρουσιάσει διαφορές σε πολυπεπίδια, ικανές ίσως να συσχετιστούν με τις παρατηρούμενες διαφορές στην διαιρετική ικανότητα, ενώ κάτι ανάλογο συμβαίνει με την αντίστοιχη μελέτη στη SOD.

## B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Φύλλα από φυτά *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πρωτοπλαστών. Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Προτιμήθηκαν φυτά ηλικίας περίπου 3 εβδομάδων και εξαιρέθηκαν τα πολύ νεαρά και τα γηρασμένα φύλλα.

### 2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ

Η απομόνωση και η καλλιέργεια των πρωτοπλαστών πραγματοποιείται σύμφωνα με την μέθοδο των Koop και Schweiger (1988). Τα φύλλα καπνού αποστειρώθηκαν επιφανειακά με 70% αιθανόλη για 30 sec και 3% υποχλωριώδους νατρίου για 15 min. Στη συνέχεια πλύθηκαν τρεις φορές με αποστειρωμένο νερό (αλλαγή κάθε 5 min). Ακολούθησε τεμαχισμός των φύλλων, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε τμήματα 0.5-1 cm, αποφεύγοντας την συμμετοχή νευρώσεων στα τεμαχισμένα τμήματα. Αυτά τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm τα οποία περιείχαν 10ml διαλύματος επώασης, που αποτελούνταν από: 2mM  $\text{CaCl}_2$ , 25mM MES, 0.4M Sucrose, 43mg/l EDFS, B5-macroelements ( 25mM  $\text{KNO}_3$ , 1mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 1mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.1mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ),

vitamins (2mg/l myoinositol, 0.02mg/l biotine, 0.2mg/l panthotenate, 0.2mg/l nicitinic acid, 0.1mg/l thiamine, 0.2mg/l pyridoxine), MS-microelements (6.2mg/l  $H_3BO_3 \cdot 6H_2O$ , 22.3mg/l  $MnSO_4(4H_2O)$ , 8.6mg/l  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.25mg/l  $Na_2MoO_4$ , 0.025mg/l  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.025mg/l  $CoCl \cdot 6H_2O$ ), 1mg/l 6-BAP και 0.1mg/l NAA, pH 5.7. Η τοποθέτηση των τεμαχισμένων φύλλων συνεχίστηκε ώσπου να καλυφθεί πλήρως η επιφάνεια του διαλύματος. Στη συνέχεια προστέθηκαν ασηπτικά 10ml διαλύματος επώασης το οποίο είχε ενισχυθεί με 2% (w/v) cellulase Onozuka R10 και 1% (w/v) macerozyme Onozuka R10. Τα τρυβλία κλείσθηκαν και τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο στους  $26 \pm 2^\circ C$  για 4 ή 16 ώρες, αντίστοιχα.

Μετά την επώαση, απομακρύνθηκε το ενζυμικό διάλυμα και αντικαταστάθηκε από 10ml διαλύματος επώασης, χωρίς ένζυμα. Το τρυβλίο ανακινήθηκε σε αναδευτήρα για 10min περίπου (120 στροφές / min) έτσι ώστε να ελευθερωθούν οι πρωτοπλάστες. Το διάλυμα των πρωτοπλαστών διηθήθηκε από γάζα και τοποθετήθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρου (15ml) ενώ πάνω από αυτό προστέθηκαν 3ml περίπου διαλύματος καλλιέργειας (όπως το διάλυμα επώασης, με εξαίρεση την sucrose, η οποία αντικαταστάθηκε από 0.4M glucose), έτσι ώστε να δημιουργηθούν δύο φάσεις. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min, 165g. Οι πρωτοπλάστες συγκεντρώθηκαν στη μεσόφαση, από όπου απομακρύνθηκαν προσεκτικά και πλύθηκαν με διάλυμα καλλιέργειας (10ml διαλύματος / σωλήνα και φυγοκέντρηση 10min, στα 165g). Το κατακρήμνισμα (πρωτοπλάστες) επαναδιαλύθηκε σε 2 περίπου ml διαλύματος καλλιέργειας και έγινε προσδιορισμός του αριθμού τους: γι' αυτό, 10μl διαλύματος και 10μl 0.25 (w/v) Evans blue τοποθετήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο. Ακολούθησε η καλλιέργεια των απομονωμένων πρωτοπλαστών σε τρυβλία με πυκνότητα 100.000 πρωτοπλάστες/ml καλλιέργειας. Τα τρυβλία κλείσθηκαν και τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο στους  $26 \pm 2^\circ C$

### 3. ΣΗΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η σήμανση των πρωτεϊνών έγινε με προσθήκη L-[ $^{35}S$ ]μεθειονίνης (NEN, Dupont, Boston, Ma. USA) (10μCi/ml) στο διάλυμα καλλιέργειας των πρωτοπλαστών, με διάρκεια 3 ωρες (Siminis et al, 1993). Η σήμανση πραγματοποιήθηκε σε διάφορες χρονικές στιγμές της καλλιέργειας των πρωτοπλαστών (όπως αναφέρθηκε προηγουμένως). Με την ολοκλήρωση του χρόνου σήμανσης, οι πρωτοπλάστες φυγοκεντρήθηκαν (2min, 14000rpm). Το

κατακρήμισμα πλύθηκε με το διάλυμα επώασης, δύο φορές και στη συνέχεια κρατήθηκε στους -80ο, μέχρι την ανάλυσή του.

#### 4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η εκχύλιση των πρωτεϊνών (κατά Flengsrud & Kobro, 1989) πραγματοποιήθηκε με κρύο διάλυμα εκχύλισης, το οποίο περιείχε 200mM Tris-Cl, pH 8, 5mM DDT, 0,5mM PMSF, 10μM leupeptin, 10% glycerol και 10% (w/v) αδιάλυτο polyvinyl-pyrrolidone το οποίο προστέθηκε στο τέλος. Η αναλογία βάρους ιστού : διαλύματος εκχύλισης ήταν 1:4. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 5min, και στη συνέχεια κρατήθηκε στον πάγο για 20min, με ενδιάμεσες αναδεύσεις. Τέλος φυγοκεντρήθηκε για 30min σε 10000 rpm (σε φυγόκεντρο Sorval, SV34 ρότορα). Το υπερκείμενο κρατήθηκε και ακολούθησε μέτρηση ολικών πρωτεϊνών με την μέθοδο Lowry (1951).

#### 5. ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΗΣ [35S]-ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗΣ ΣΤΙΣ ΟΛΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Για τον καθορισμό της ενσωμάτωσης ραδιενέργειας στην ολική πρωτεΐνη, αναμίχθηκαν 20μl εκχυλίσματος με 20μl 20% (w/v) TCA και επώαστηκαν για 1h στους 4οC. Το κατακρήμισμα που σχηματίστηκε πλύθηκε με 10% (w/v) TCA και επαναδιαλύθηκε σε 200μl 0.2N NaOH. Στη συνέχεια αναμίχθηκε με 5ml σπινθηριστικού υγρού (το οποίο περιείχε 63,3% (v/v) Toluene, 0,55% (w/v) PPO, 0,01% (w/v) POPOP και 33% (v/v) TritonX100).

#### 6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ

Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων έγινε σύμφωνα με τον O'Farrell (1975). Η πρώτη διάσταση ήταν ισοηλεκτρική εστίαση παρουσία 9,5M ουρίας, η οποία εκτελέστηκε σε συσκευή 2001-600 Tube Gel Electrophoresis Kit. Τα κυλινδρικά πηκτώματα (3mm x 15cm) περιείχαν 13,3% ακρυλαμίδα (acrylamide : bis, 30 : 1,6), 9,5M ουρία, 2% (v/v) Nonident P-40, 5% (v/v) αμφολύτες (4% pH range 5-8 και 1% pH range 3,5-10). Τα πηκτώματα έτρεξαν αρχικά (prerunned) στα 200V για 15min, στα 300V για 30min και στα 400V για 60min, χρησιμοποιώντας 10mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ως διάλυμα ανόδου και 20mM NaOH ως διάλυμα καθόδου, ενώ είχαν εφαρμοστεί 30μl από το διάλυμα λύσης: 9,5M ουρία, 2% (v/v) Nonident P-40, 5% (v/v) μερκαπτοαιθανόλη, 2% αμφολύτες (1,6% pH range 5-8 και 0,4% pH range 3,5-10), τα οποία καλύφθηκαν με 20μl 8M ουρίας και 1% αμφολυτών.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν στα πηκτώματα τα δείγματα έτσι ώστε κάθε ένα να περιέχει 100.000 cpm. Τα δείγματα είχαν ρυθμιστεί στο διάλυμα λύσης, που αναφέρθηκε και καλύφθηκαν, επίσης με 20μl 8M ουρίας και 1% αμφολυτών. Η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 400V για 15h και 800V για 1h, στους 20°C. Τα πηκτώματα στη συνέχεια αφαιρέθηκαν από τους σωλήνες και εξισορροπήθηκαν σε ένα διάλυμα που περιείχε 62,5mM Tris-Cl pH 6,8, 10% (v/v) γλυκερόλη, 2% (1w/v) SDS και 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη για 20min, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η δεύτερη διάσταση, SDS-PAGE (κατά Laemmli, 1970), η οποία πραγματοποιήθηκε σε συσκευή LKB 001 Vertical Electrophoresis. Το πήκτωμα ανάλυσης (resolving gel) περιείχε 11% (w/v) πολυακρυλαμίδη (ακρυλαμίδη : bis-ακρυλαμίδη, 30 : 0,2) ενώ το πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking gel) περιείχε 4% πολυακρυλαμίδη ίδιας αναλογίας. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 25mM Tris-192mM γλυκίνη, pH 8,1, και 0,1% (w/v) SDS. Τα κυλινδρικά πηκτώματα εφαρμόστηκαν για την δεύτερη διάσταση με την βοήθεια ζεστής αγαρόζης [1% (w/v) αγαρόζης σε διάλυμα εξισορρόπησης]. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 20mA ανά πήκτωμα, μέχρι το μέτωπο να φτάσει στο πήκτωμα ανάλυσης και στα 30mA στη διάρκεια της ανάλυσης, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την συμπλήρωση της ηλεκτροφόρησης, τα πηκτώματα χρωματίστηκαν με 0,1% Coomassie brilliant blue R-250 σε 50% (v/v) μεθανόλη -10% (v/v) οξικό οξύ για 3h και αποχρωματίστηκαν σε διάλυμα 10% (v/v) μεθανόλης -7% οξικού οξέους. 7. ΑΥΤΟΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ Μετά την SDS-PAGE και τον χρωματισμό, τα πηκτώματα ξηράνθηκαν πάνω σε διηθητικό χαρτί και εκτέθηκαν σε φιλμ ακτίνων X (KODAK) στους -80°C για διάφορα χρονικά διαστήματα.

#### 8. ΦΥΣΙΚΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΓΙΑ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ SOD

Δείγματα πρωτοπλαστών εκχυλώστηκαν όπως αναφέρθηκε για τα σημασιμενα δειγματα. Ακολούθησε φυσική ηλεκτροφορηση για την αναλυση των ισοενζυμων της SOD, σύμφωνα με τροποποιηση της μεθοδου του Davis (1964), όπως αναφερεται παρακατω. Για την αναλυση αυτη χρησιμοποιηθηκαν 1.5mm παχους επιπεδα πηκτωματα και μοντελο mini Protean II της BioRad. Το πηκτωμα αναλυσης (resolving gel) περιειχε 10% πολυακρυλαμιδη (αναλογια ακρυλαμιδη : bis-ακρυλαμιδη, 30 : 0,2) και το πηκτωμα συμπυκνωσης (stacking gel) περιειχε 4% πολυακρυλαμιδη, ιδιας αναλογιας. Το διαλυμα ηλεκτροφορησης περιειχε 25mM Tris-

192mM γλυκίνη, σε pH 8,1. Η ηλεκτροφορήση έγινε στους 4°C σε 20mA για 2h περίπου.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφορήσης, οι ζώνες με ενεργότητα SOD, εντοπίστηκαν με την μέθοδο των Beauchamp και Fridovich (1971). Το πηκτώμα επώαστηκε για 30min σε διάλυμα με 0.2% (w/v) 4-nitroblue tetrazolium chloride (NBT) σε 50mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, στο σκοτάδι. Αφού αφαιρέθηκε το προηγούμενο διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα χρωσης, το οποίο περιέχει 0.01% (w/v) ριβοβλαβίνη και 0,25 (v/v) TEMED σε 50mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4, στο σκοτάδι. Παρουσία φωτός εμφανίστηκαν οι ζώνες των ισοενζύμων.

#### 9. ΑΝΟΣΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ

Οι πρωτείνες αναλήθηκαν αρχικά σε πηκτώματα SDS-βολυακρυλαμίδης, σύμφωνα με την μέθοδο του Laemmli (1970), χρησιμοποιώντας επίπεδα πηκτώματα 1,5mm πάχους και το μοντέλο Protean II της Bio-Rad. Η συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης (acrylamide : bis, 30 : 0.8) στο πηκτώμα ανάλυσης ήταν 13% (w/v) και στο πηκτώμα συμπύκνωσης 4% (w/v). Τα δείγματα επώαστηκαν, πριν την ηλεκτροφορήση, στους 100°C για 5min, μετά την προσθήκη 3X συμπύκνωμένου διαλύματος (εκχυλισμα : διάλυμα, 2 : 1) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 62,5mM Tris-Cl pH 6,8, 10% (v/v) γλυκερόλη, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη. Η ηλεκτροφορήση έγινε στα 20mA ανά πηκτώμα, μέχρι το μετώπο να φτάσει στο πηκτώμα ανάλυσης και στα 30mA στη διάρκεια της ανάλυσης, σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα ηλεκτροφορήσης περιείχε 25mM Tris-192mM γλυκίνη, pH 8.1 και 0,1% (w/v) SDS.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφορήσης, έγινε μεταφορά των αναλυμένων πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης, όπως περιγράφηκε από τον Loulakakis et al (1991). Το διάλυμα μεταφοράς περιείχε 25mM Tris-192mM γλυκίνης, pH 8,1. Η μεταφορά έγινε ηλεκτροφορητικά στα 80V για 1h περίπου, χρησιμοποιώντας την συσκευή της BioRad. Οι ελεύθερες θέσεις πάνω στην νιτροκυτταρίνη δεσμεύτηκαν με 2% (w/v) BSA σε phosphate buffered saline (PBS: 0,8% (w/v) NaCl, 0,02% (w/v) KCl, 0,115% (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,02% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Τα φίλτρα πλύθηκαν 3 φορές για 5min, με διάλυμα πλύσης (PBS συμπληρωμένο με 0,05% (v/v) Tween-20) και επώαστηκαν με το επιθυμητό αντισώμα της SOD (anti-2,4-SOD για τα Cu/ZnSOD ισοενζύμα) για 2 έως 5h. Τα φίλτρα πλύθηκαν 5 φορές για 5min και επώαστηκαν 1h με το δεύτερο αντισώμα (alkaline phosphatase προσδεμένη σε antirabbit IgG,



αραιωση 1:2000). Ακολουθούν 2 πλυσίματα των 5min στο προηγούμενο διαλυμα πλυσίματος, συν 2 πλυσίματα των 5min με 0,1M DEA (Diethanolamine), pH 9,6. Τα συμπλοκα αντιγονου - αντισωματος εγιναν ορατα με την προσθηκη του διαλυματος αντιδρασης [0,01% (w/v) NBT,0,005% (w/v) Bcip (5-dromo-4-chloro-3indolylphosphate), 0,1M DEA, pH 9,6]. Οι αραιωσεις του πρωτου και του δευτερου αντισωματος εγιναν σε PBS που περιειχε 1% (w/v) BSA και 0,05% (v/v) Tween 20.

#### 10.ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Η ανασοκατακρημνιση της Cu/ZnSOD εγινε σε ραδιενεργα δειγματα πρωτοπλαστων. Η διαδικασια ξεκινησε με επωαση του ραδιενεργου πρωτεινικου εκχυλισματος (100.000 cpm/δειγμα), το οποιο ειχε ρυθμιστει σε 150mM NaCl και 1% TritonX100, με 5μl αντισωματος για 1h σε θερμοκρασια δωματιου και 15h στους 4oC. Το συμπλοκο αντιγονου-αντισωματος που σχηματιστηκε, δεσμευτικε σε protein A- sepharose (20μl protein A-sepharose για 2h στους 4oC) και στην συνεχεια, κατακρημνιστηκε και πλυθηκε (3 φορες για 5min), με 40mM Tris-Cl, pH 6,6, 2% (v/v) TritonX100, 150mM NaCl. Ακολουθησε ενα πλυσιμο με 49mM Tris-Cl, pH 6,6, 2% TritonX100 και επαναδιαλυση του ιζηματος σε μικρο ογκο που περιειχε 62,5mM Tris-Cl, pH 6,8, 3% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανολης και 10% γλυκερολη. Μετα απο επωαση στους 100oC για 5min, ακολουθησε SDS-PAGE και αυτοραδιογραφια (Loulakakis et al, 1990).

#### Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### 1.ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΔΙΑΙΡΕΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ.

Η παρουσιαση της βιωσιμοτητας και της διαιρετικης ικανοτητατων αναγεννομενων και μη, πρωτοπλαστων (πρωτοπλαστες που προηλθανμετα απο 4 και 16h επωαση με τα ενζυμα αποικοδομησης τουκυτταρικου τοιχωματος, αντιστοιχα), φαινεται στην Εικονα Γ1 και Γ2, αντιστοιχα. Απο τα αποτελεσματα αυτα συμπεραινεται οτι ηδιαρκεια της ενζυμικης πεψης επιδρα καταλυτικα στην βιωσιμοτητακαι την διαιρετικη ικανοτητα: η μεγαλη διαρκεια προκαλει μειωσητης βιωσιμοτητας, ενω η διαιρετικη ικανοτητα ελαττωνεται στο μισο σε συγκριση με αυτη των αναγεννομενων πρωτοπλαστων, πουπροκυπτουν απο μικροτερο χρονο δρασης των πεπτικων ενζυμων.Για παραδειγμα, την τεταρτη ημερα καλλιεργειας, το 89% των αναγεννομενων πρωτοπλαστων ηταν βιωσιμοι (σε σχεση με το 63,6% των μη αναγεννομενων), ενω ενα ποσοστο 22,2% (σε σχεση με 9,2%), ειχε υποστει την πρωτη διαιρεση.

Είναι, βεβαία, γεγονός ότι η παραγωγή πρωτοπλαστών είναι μικρότερη όσο μειώνεται ο χρόνος δράσης των ενζύμων, όμως η επίδραση του χρόνου αυτού πάνω στις βασικές διαδικασίες της επιβίωσης και της διαίρεσης, είναι κρίσιμη. Χρησιμοποιώντας ενδιάμεσους χρόνους (8 και 12h ενζυμικής επίδρασης), παρατηρήθηκε μείωση της βιωσιμότητας και της διαιρετικής ικανότητας σε σχέση με τους αναγενομένους πρωτοπλαστες, πράγμα το οποίο αναμενόταν. Τα προηγούμενα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι η δράση των ενζύμων είναι ουσιαστικής σημασίας για την επακόλουθη αναπτυξιακή πορεία των πρωτοπλαστών. Οφείλει να διερευνηθεί το θέμα των συνεπειών της επίδρασης τους πάνω στα κυττάρια σε σχέση με την καθαρότητα τους και την ικανότητα τους να επαγουν επικινδύνες καταστάσεις.

## 2. ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.

### A. Αναγενομένοι πρωτοπλαστες.

Στον Πίνακα Γ1 παρουσιάζονται οι αλλαγές των *de novo* συντιθεμένων πεπτιδίων, κατά την καλλιέργεια των αναγενομένων πρωτοπλαστών. Αρχίζοντας από τα πολυπεπτιδικά μεγάλου Μοριακού Βάρους (στην περιοχή από 200000 έως περίπου 69.000 Da), παρατηρείται μια σημαντική μείωση στον αριθμό των πρωτεϊνών, την δεύτερη μέρα καλλιέργειας: γύρω στα 20 πολυπεπτιδικά εξαφανίζονται ενώ αυτά που συνεχίζουν να συντίθενται (γύρω στα 10), χαρακτηρίζονται από μειωμένο ρυθμό σύνθεσης τους (την έκτη ημέρα υπάρχουν μόνο 5!). Όσον αφορά την τέταρτη ημέρα καλλιέργειας, παρατηρείται μια απότομη αύξηση στον αριθμό των πρωτεϊνών αυτής της περιοχής: εμφανίζονται 19 νέα πολυπεπτιδικά, από οποία σχεδόν όλα εξαφανίζονται την έκτη ημέρα.

Μελετώντας την περιοχή από 69.000 έως 46.000 Da, παρατηρείται σχεδόν το ίδιο πρότυπο, όπως και προηγουμένως: μείωση του ρυθμού σύνθεσης των πολυπεπτιδίων, την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας, εμφάνιση πολλών νέων την τέταρτη ημέρα και μείωση έως εξαφάνιση αυτών, την έκτη ημέρα καλλιέργειας. Στην οξίνη περιοχή, εμφανίζονται, σταδιακά, διάφορα πολυπεπτιδικά τα οποία φτάνουν σε κορυφαία αύξηση του αριθμού τους την τέταρτη ημέρα καλλιέργειας, ενώ στην συνέχεια μειώνονται ή και εξαφανίζονται. Υπάρχουν, βεβαία, πάντα πολυπεπτιδικά τα οποία διατηρούνται κατά την διάρκεια της καλλιέργειας ( $\Delta 1, \Delta 2$ ) και άλλα που, ενώ παρουσιάζουν μια παροδική αύξηση στην σύνθεσή τους, στην συνέχεια εξαφανίζονται ( $\Delta 13, \Delta 14$ ).

Στην περιοχή από 46.000 έως και 14.300 Da, παρατηρείται μείωση των βασικών πολυπεπτιδίων κατά την καλλιέργεια, μέχρι ολική εξαφάνιση κάποιων (Γ1-Γ5), ενώ η ουδέτερη και οξίνη περιοχή εμπλουτίζεται με νέα πολυπεπτιδία. Κάποια άλλα παρουσιάζουν αυξημένους ρυθμούς συσσώρευσης: πχ. το Γ22 αυξάνει συνεχώς κατά την καλλιέργεια, ενώ τα Γ23, Γ24, Γ25, Γ26 εμφανίζουν μια οξεία αλλά παροδική αύξηση την δεύτερη ημέρα. Τέλος, στην περιοχή από 30.000 έως 21.500 Da, παρατηρείται μείωση των οξίνων πολυπεπτιδίων, την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας.

Σε γενικές γραμμές, συμπεραίνονται τα ακόλουθα:

Δεύτερη ημέρα καλλιέργειας: Μείωση του ρυθμού σύνθεσης αρκετών πολυπεπτιδίων αλλά, και εμφάνιση νέων. Κάποια πολυπεπτιδία παρουσιάζουν παροδική και οξεία αύξηση.

Τετάρτη ημέρα καλλιέργειας: Εμφάνιση νέων πολυπεπτιδίων μεγάλου MB και αύξηση του ρυθμού σύνθεσης των ουδέτερων και των οξίνων πολυπεπτιδίων.

Εκτη ημέρα καλλιέργειας: Μετατόπιση της πρωτεϊνοσύνθεσης προς οξίνα πολυπεπτιδία μικρού MB.

B.Μη αναγεννομένοι πρωτοπλαστες.

Στον Πίνακα Γ2 παρουσιάζονται οι διαφορές που παρατηρήθηκαν κατά την καλλιέργεια των μη αναγεννομένων πρωτοπλαστών. Έτσι στην περιοχή MB από 200.000 έως 69.000 Da, υπάρχει επαγωγή πεπτιδίων μεγάλου MB την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας, η σύνθεση των οποίων μειώνεται την τετάρτη μέρα και αυξάνει ξανά την εκτη. Υπάρχει ένας αριθμός (περίπου 10) πολυπεπτιδίων, τα οποία διατηρούνται κατά την διάρκεια της καλλιέργειας με μικρές αυξομειώσεις στην σύνθεση τους (δ8,δ9).

Μελετώντας την περιοχή από 69.000 έως 30.000 Da, παρατηρείται μείωση στον ρυθμό σύνθεσης των πολυπεπτιδίων της βασικής περιοχής, την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας, η οποία διατηρείται και την τετάρτη ημέρα, οπότε και εμπλουτίζεται με νέα (5) πολυπεπτιδία. Την εκτη ημέρα υπάρχει μια αύξηση στον ρυθμό σύνθεσης των περισσότερων. Προχωρώντας προς την ουδέτερη περιοχή, παρατηρείται εμφάνιση νέων πολυπεπτιδίων την δεύτερη ημέρα, τα οποία διατηρούνται μέχρι και την εκτη, όπου υπάρχει αύξηση στην σύνθεση τους, όπως και στην σύνθεση αυτών που υπήρχαν από την αρχή της καλλιέργειας. Την ίδια ημέρα εμφανίζονται και αρκετά νέα. Όσον αφορά την οξίνη περιοχή, αυτή χαρακτηρίζεται από σταδιακή αύξηση τόσο

στον αριθμο οσο και στον ρυθμο συσσωρευσης των πολυπεπτιδιων, με κορυφωση την εκτη ημερα καλλιεργειας.

Τελος, η περιοχη απο 30.000 εως 14.300 Da, παρουσιαζει διατηρηση των βασικων πολυπεπτιδιων (α1,α2), μειωση των ουδετερων (α3,α4,α5,α6) και χαλαρη αυξηση των οξινων, κυριως την τεταρτη και εκτη ημερα καλλιεργειας.

Περιληπτικα, παρατηρουνται τα ακολουθα:

Δευτερη ημερα καλλιεργειας: Αυξηση στον ρυθμο συνθεσης των ουδετερων, κυριως, πολυπεπτιδιων και εμφανιση μικρου αριθμου νεων.

Τεταρτη ημερα καλλιεργειας: Μειωση στον ρυθμο συνθεσης πολυπεπτιδιων μεγαλου MB και αυξηση στον ρυθμο συσσωρευσης πολυπεπτιδιων μικροτερου MB (ιδιαιτερα, των οξινων πολυπεπτιδιων).

Εκτη ημερα καλλιεργειας: Αυξηση στην συνθεση και εμφανιση πολυπεπτιδιων σ'ολο το ευρος του pI και του MB.

Γ.Συγκριση των δυο πληθυσμων.

Η συγκριση αφορα τα πολυπεπτιδια που υπαρχουν στην αρχη της καλλιεργειας και μετα απο δυο ημερες καλλιεργειας οπου οι διαιρεσεις εχουν ηδη ξεκινήσει για τους αναγεννομενους πρωτοπλαστες οποτε αναμενεται η παρουσια χαρακτηριστικων πολυπεπτιδιων. Ξεκινώντας απο την αρχη της καλλιεργειας παρατηρουνται κοινα πολυπεπτιδια στους δυο πληθυσμους (55, βλ. Πιν. Γ3).Στην περιοχη απο 200.000 εως 46.000 Da, αυτα εχουν μεγαλυτερο ρυθμο συσσωρευσης στους αναγεννομενους πρωτοπλαστες, στην αρχη της καλλιεργειας, ενω αντιθετα την δευτερη ημερα τα περισσοτερα απ' αυτα, μειωνονται ή εξαφανίζονται (c1-c10, d1, d2).Τα κοινα πολυπεπτιδια διατηρουνται στους μη αναγεννομενους πρωτοπλαστες οπου ειναι σχεδον, τα μοναδικα που υπαρχουν σ' αυτην την περιοχη, ενω στους αναγεννομενους παρατηρουνται και πολλα αλλα. Το ιδιο περιπου προτυπο ακολουθειται και στις υπολοιπες περιοχες, πραγμα το οποιο φαινεται να οδηγει στο συμπερασμα οτι τα κοινα αυτα πολυπεπτιδια σχετιζονται με καποιες κοινες διαδικασίες που υφιστανται οι δυο πληθυσμοι.

Οσον αφορα τις πρωτεινες ενδιαμεσου MB (απο 46.000 εως 21.500 Da), υπαρχει μια ομαδα 12 βασικων πολυπεπτιδιων, τα οποια ειναι κοινα στους δυο πληθυσμους στην αρχη της καλλιεργειας, κατα την δευτερη ομως, ημερα, εξαφανίζονται στους αναγεννομενους πρωτοπλαστες (τα b11 και b12,

διατηρούνται), ενώ 5 από αυτά διατηρούνται και αυξάνουν στους μη αναγεννομένους. Προχωρώντας προς την ουδέτερη περιοχή παρατηρείται αύξηση στον ρυθμό σύνθεσης των περισσότερων κοινών πρωτεϊνών στους μη αναγεννομένους πρωτοπλαστες, ενώ πολλά νέα πολυπεπτιδία εμφανίζονται στους αναγεννομένους. Στην οξίνη, δε, περιοχή, παρατηρείται μια υπερβολική αύξηση 5 πολυπεπτιδίων στους αναγεννομένους πρωτοπλαστες, δύο από τα οποία είναι κοινά με τους μη αναγεννομένους (b3, b24), στους οποίους υπάρχει μια σχετική αύξηση, όχι όμως της ίδιας έντασης.

Τέλος, για την περιοχή από 21.500 έως 14.500Da, τα 2 βασικά πολυπεπτιδία a1 και a2 εξαφανίζονται την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας στους αναγεννομένους πρωτοπλαστες, ενώ υπάρχει μια σταδιακή μείωση των υπολοίπων πολυπεπτιδίων αυτής της ομάδας. Αντιστρόφως, στους μη αναγεννομένους πρωτοπλαστες, παρατηρείται διατήρηση των τριών βασικών πολυπεπτιδίων και μια σταδιακή μείωση των υπολοίπων, κατά την καλλιέργεια. Τα έξι αυτά πολυπεπτιδία ίσως έχουν κοινό σημαντικό ρόλο, αφού τα βασικά εμφανίζονται ξανά την έκτη ημέρα στους αναγεννομένους πρωτοπλαστες, πράγμα το οποίο δεν συμβαίνει για τα αντίστοιχα, στους μη αναγεννομένους.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την προηγούμενη σύγκριση είναι τα ακόλουθα:

1. Ο ρυθμός εμφάνισης νέων πολυπεπτιδίων και αλλαγής των ήδη υπαρχόντων, είναι πολύ μεγαλύτερος (σχεδόν διπλασιός), στους αναγεννομένους πρωτοπλαστες, σε σχέση με τους μη αναγεννομένους, τόσο στην αρχή, όσο και κατά την διάρκεια της καλλιέργειας.

2. Τα πολυπεπτιδία που συντίθενται από τους μη αναγεννομένους πρωτοπλαστες, την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας, είναι μεγάλου MB και αντιστοιχούν στην οξίνη και την ουδέτερη περιοχή του pI (12 νέα πολυπεπτιδία, μόνο 3 από τα οποία είναι βασικά). Αντιστρόφως, οι αναγεννομένοι πρωτοπλαστες συνθέτουν πολυπεπτιδία σ' όλο το φάσμα του MB και του pI (παρουσιάζοντας μια τάση για πολυπεπτιδία μεγάλου MB την τέταρτη ημέρα καλλιέργειας και μικροτέρου MB, την έκτη).

3. Τα πολυπεπτιδία που αυξάνουν κατά την διάρκεια της καλλιέργειας στους μη αναγεννομένους πρωτοπλαστες, εντοπίζονται προς την οξίνη και ουδέτερη περιοχή, ενώ για τους αναγεννομένους, παρατηρείται αύξηση σ' όλες τις περιοχές με

το εξής χαρακτηριστικό: τα οξίνα πολυπεπτιδία αρχίζουν να παρουσιάζουν υψηλούς ρυθμούς συνθεσης και εμφάνισης, την τεταρτη ημέρα καλλιέργειας, για τους αναγεννομένους πρωτοπλαστες, ενώ αυτό συμβαίνει την εκτη ημέρα για τους μη αναγεννομένους και με πολύ χαμηλότερη ένταση.

4. Τα πολυπεπτιδία τα οποία παρουσιάζουν μειωμένους ρυθμούς αύξησης, αντιστοιχούν μάλλον στην βασική, κυρίως, περιοχή και για τους δύο πληθυσμούς πρωτοπλαστών.

5. Όσον αφορά τα κοινά πολυπεπτιδία των δύο πληθυσμών, τα περισσότερα απ' αυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερο ρυθμό συνθεσης στους αναγεννομένους πρωτοπλαστες, στην αρχή της καλλιέργειας, ενώ ένας μεγάλος αριθμός παρουσιάζει ομοία τάση αύξησης και στους δύο πληθυσμούς. Την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας, ένας σημαντικός αριθμός των κοινών πολυπεπτιδίων (18), εξαφανίζεται στους αναγεννομένους πρωτοπλαστες, ενώ διατηρείται στους μη αναγεννομένους (μόνο 8 εξαφανίζονται), και στο σύνολο τους φαίνεται να αυξάνουν. Υπάρχουν δύο πολυπεπτιδία που εμφανίζονται την δεύτερη ημέρα στους μη αναγεννομένους πρωτοπλαστες, ενώ υπήρχαν ήδη στην αρχή της καλλιέργειας στους αναγεννομένους. Το ίδιο συμβαίνει για μια ομάδα 4 πολυπεπτιδίων (ε περιοχή), τα οποία υπήρχαν στους αναγεννομένους πρωτοπλαστες, αλλά εμφανίστηκαν στους μη αναγεννομένους την δεύτερη ημέρα, κατά την οποία, στους αναγεννομένους, είχαν εξαφανιστεί. Γενικά, δεν υπάρχει επαγωγή αντιστοιχών πολυπεπτιδίων, κατά την διάρκεια της καλλιέργειας.

### 3. ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΗΝ SOD, ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.

Στην εικόνα, φαίνονται οι αλλαγές που συμβαίνουν στην ενεργότητα της Cu/ZnSOD (2,4-SOD), κατά την διάρκεια της καλλιέργειας αναγεννομένων και μη, πρωτοπλαστών (Α και Γ). Επίσης, εμφανίζονται οι αλλαγές της SOD κατά την καλλιέργεια πρωτοπλαστών, οι οποίοι απομονώθηκαν μετά από 8h επώασης με τα ενζύμα αποικοδομησης του κυτταρικού τοιχώματος (Β), και οι οποίοι παρουσιάζουν μια ενδιαμεση κατάσταση, όσον αφορά την βιωσιμότητα και την διαιρετική ικανότητα. Αυτό που παρατηρείται είναι αύξηση στην ενεργότητα της SOD, όσο αυξάνει η διάρκεια της ενζυμικής πέψης, καθώς και μια σταδιακή αύξηση κατά την διάρκεια της καλλιέργειας.

Προκειμένου να χαρακτηριστεί η ποσότητα του ισοενζύμου αυτού (Cu/ZnSOD), κατά την καλλιέργεια, γίνεται μεταφορά σε Western blot και

ανοσοεντοπισμος με το αντιστοιχο αντισωμα (anti-2,4-SOD),(εικ ). Αυτο που παρατηρειται ειναι αυξημενη ποσοτητα στους αναγεννομενους πρωτοπλαστες σε σχεση με τους μη αναγεννομενους (Α και Γ, αντιστοιχα).

Το τελευταιο αποτελεσμα ερχεται σε αντιθεση με το προηγουμενο, οπου μεγαλυτερη ενεργοτητα παρατηρειται στους μη αναγεννομενους πρωτοπλαστες. Η εξηγηση μπορει, ισως, να δωθει απο το γεγονος οτι στους αναγεννομενους πρωτοπλαστες υπαρχει, βεβαια, μεγαλυτερη ποσοτητα ενζυμου, ομως, εξαιτιας του οτι η ενταση του οξειδωτικου στρες ειναι μικροτερη, το ενζυμο παρουσιαζει

μικροτερη ενεργοτητα, ικανη ομως να αντιμετωπισει και να ξεπερασει την συγκεκριμενη κατασταση πιεσης. Οσον αφορα τους μη αναγεννομενους πρωτοπλαστες, η αυξημενη ενεργοτητα ειναι αναμενομενη σε σχεση με το ισχυρο στρες που εχουν υποστει, ομως, επειδη υπαρχει μεγαλη πιθανοτητα να μην υπερνικηθει (πραγμα που τελικα συμβαινει), δεν συντιθεται αρκετη ποσοτητα πρωτεινης, με αποτελεσμα αυτη που ηδη υπαρχει να αυξανει την ενεργοτητα της στο μεγαιστο δυνατο.

Η προηγουμενη υποθεση ενισχυεται απο την παρατηρηση οτι οι πρωτοπλαστες τυπου Β παρουσιαζουν μειωμενη ενεργοτητα σε σχεση με τους μη αναγεννομενους (λογω του οτι το στρες ειναι λιγοτερο εντονο), και αυξημενη ποσοτητα ενζυμου σε σχεση με τους αναγεννομενους (λογω του οτι το στρες ειναι περισσοτερο εντονο), ετσι ωστε να υπαρξει οσο το δυνατον καλυτερη αντιμετωπιση και τελικα υπερβαση του στρες.

Η ανοσοκαθιζηση ραδιενεργων δειγματων πρωτοπλαστων με anti-2,4 SOD (εικ. ), συμβαδιζει με την προηγουμενη υποθεση: στην αρχη της καλλιεργειας (0h) των αναγεννομενων πρωτοπλαστων υπαρχει αυξημενη συνθεση SOD, η οποια ομως δεν παρατηρειται τις επομενες τις επομενες ημερες καλλιεργειας (2d, 4d) των μη αναγεννομενων πρωτοπλαστων.

#### Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Ειναι γνωστο οτι η αλλαγη στην γονιδιακη εκφραση, η οποια εμφανιζεται με αλλαγες στα πρωτεινικα προτυπα, εμπλεκεται με την διαδικασια της αποδιαφοροποιησης, ως προιον ή αιτια αυτης. Εχει προταθει οτι υπαρχει αμεση συσχετιση αναμεσα στην συνθεση πρωτεινων και την επανεισοδο στον κυτταρικο κυκλο, διαφοροποιημενων, μη διαιρουμενων κυτταρων μεσοφυλλου (Meyer & Chartier, 1981, Meyer et al, 1984). Ειναι λοιπον, πιθανο, οτι μια συγκριτικη μελετη

μεταξύ αναγεννομένων και μη πρωτοπλαστών, σε επίπεδα de novo συντιθέμενων πρωτεϊνών, πριν και κατά την διάρκεια της καλλιέργειας, μπορεί να εμφανίσει χαρακτηριστικές διαφορές, ικανές να συνδεθούν με την επανέναρξη ή όχι της κυτταρικής διαίρεσης.

Οι αναγεννομένοι πρωτοπλαστες εμφανίζουν μια σειρά πολυπεπτιδίων την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας, τα οποία εντοπίζονται στην οξίνη και βασική περιοχή του pI, ενώ το MB τους ποικίλει. Τα πολυπεπτιδία τα οποία αυξάνουν κατά την καλλιέργεια αντιστοιχούν σε ποικίλα MB και pI, ενώ μείωση περυσιαζεται στον ρυθμό συσσωρευσης των πολυπεπτιδίων της βασικής περιοχής.

Αντιθέτα, οι μη αναγεννομένοι πρωτοπλαστες χαρακτηρίζονται από επαγωγή πεπτιδίων με MB χαμηλότερο από 100 kDa, τα οποία εντοπίζονται στην οξίνη και οξιδετερη περιοχή του pI. Όσον αφορά τα πολυπεπτιδία τα οποία αυξάνουν κατά την καλλιέργεια, ακολουθούν το ίδιο πρότυπο με τα νεοεμφανισθέντα πολυπεπτιδία. Τέλος, τα πολυπεπτιδία που μειώνονται, αντιστοιχούν σε ποικίλα και pI.

Αναμεσα στους δύο πληθυσμούς, έχουν εντοπιστεί κοινά πολυπεπτιδία στην αρχή της καλλιέργειας, τα οποία διατηρούνται στους μη αναγεννομένους πρωτοπλαστες, ενώ τα περισσότερα μειώνονται ή και εξαφανίζονται στους μη αναγεννομένους. Είναι χαρακτηριστικό ότι ένας αριθμός πολυπεπτιδίων που ήδη υπήρχε στην αρχή της καλλιέργειας, στους αναγεννομένους πρωτοπλαστες, εμφανίζεται μόλις την δεύτερη ημέρα στους μη αναγεννομένους, ενώ η εκλεκτική διατήρηση κάποιων άλλων, κατά την καλλιέργεια, ίσως, είναι ιδιαίτερης σημασίας για το στάδιο αποδιαφοροποίησης / διαφοροποίησης, που βρίσκονται οι δύο πληθυσμοί. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι ο ρυθμός πρωτεϊνοσύνθεσης είναι αυξημένος, σχεδόν στο διπλάσιο, στους αναγεννομένους πρωτοπλαστες, και ότι η επαγωγή νέων πολυπεπτιδίων είναι χωρίς συσχέτιση στους δύο πληθυσμούς.

Οι δύο πληθυσμοί πρωτοπλαστών καπνού, ξεχωρίζουν από την διαφορετική ικανότητα επιβίωσης και διαίρεσης ως αποτέλεσμα του χρόνου επίδρασης των ενζύμων αποικοδομησης του κυτταρικού τοιχώματος, πράγμα το οποίο δρα καταλυτικά στο πεπρωμένο των κυττάρων. Τα κύτταρα μεσοφυλλού παραμένουν στην G0 φάση. Για να μπορέσουν να υπεισελθούν στον κυτταρικό κύκλο θα πρέπει να ξεπεραστεί το περιοριστικό σημείο μεταξύ G1/S, πράγμα το οποίο δεν επιτυγχάνεται στους μη αναγεννομένους πρωτοπλαστες. Στους μη αναγεννομένους πρωτοπλαστες υπάρχει ενεργή πρωτεϊνοσύνθεση και σύνθεση DNA, χωρίς, όμως, να παρατηρείται



μιτώση. Γνωρίζοντας ότι κατά τον κυτταρικό κύκλο, υπάρχουν σημεία ελέγχου, τα οποία επιτρέπουν την έναρξη κάποιου γεγονότος μόνο αν ολοκληρωθεί το προηγούμενο (Hartwell, 1991, Hartwell & Weinert, 1989), θεωρείται, ότι για κάποιον λόγο, το G1/S σημείο ελέγχου δεν μπορεί να ξεπεραστεί στους μη αναγεννομένους πρωτοπλάστες.

Μια υπόθεση για το προηγούμενο φαινόμενο, θεωρεί ότι υπάρχει ανεπαρκής παροχή κρίσιμων συστατικών (Van't Hof et al, 1972), πράγμα το οποίο, μάλλον, δεν συμβαίνει (Jung & Warnicke, 1992), αφού πιστεύεται ότι οι αυξητικοί ρυθμιστικοί παράγοντες (αυξίνη και κυτοκίνη), έχουν κρίσιμο ρόλο για την μετατόπιση προς το μιτωτικό πρόγραμμα (Bergounioux et al, 1988, Meyer & Chartier, 1981, Meyer et al, 1984).

Στην περίπτωση που εξετάστηκε (διαφορετικοί πληθυσμοί πρωτοπλάστων από τον ίδιο ιστο-δοτή και το ίδιο φυτικό είδος), η ορμονική μεταχείριση είναι πανομοιότυπη, άρα το πρόβλημα δεν εντοπίζεται σ' αυτό το σημείο. Έτσι το θέμα επανέρχεται στην διάρκεια της ενζυμικής πέψης, η οποία φαίνεται να επιδρά κατασταλτικά στην επαγωγή κάποιων γονιδιακών προϊόντων, τα οποία απαιτούνται για το ξεπεράσμα των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου: για παράδειγμα, το γονιδιακό προϊόν *cdc18* του *S.pombe* είναι απαραίτητο για την έναρξη της μιτώσης, δρώντας ως σημαντής της S φάσης έτσι ώστε, αφού "αναγνωρίσει" την ολοκλήρωση του διπλασιασμού του DNA, να επιτρέψει την μεταβαση στην M φάση του κύκλου (Kelly et al, 1993). Αναζητείται λοιπόν, ένας περιορισμένος αριθμός γονιδιακών προϊόντων, τα οποία είναι ειδικά της S φάσης και 3 τέτοια mRNA έχουν βρεθεί (Kodama et al, 1988, Ohnishi et al, 1990).

Οι ποσοτικές αλλά, κυρίως, οι ποιοτικές αλλαγές στα πρωτεϊνικά προτύπα των δύο πληθυσμών πρωτοπλάστων που μελετήθηκαν, παρουσιάζει ενδιαφέρον, όμως δεν υπάρχει προφανής συσχέτιση συγκεκριμένης γονιδιακής έκφρασης με αποδιαφοροποίηση και διαίρεση. Για το λόγο αυτό έγινε προσπάθεια σύνδεσης της αναγεννητικής ικανότητας με το οξειδωτικό στρες, έχοντας υπόψη ότι η αυξημένη επίδραση των πεπτικών ενζύμων προκαλεί οξειδωτικό στρες, με σημαντικές και καταστροφικές επιδράσεις πάνω στην επιβίωση και την διαιρετική ικανότητα των πρωτοπλάστων (Siminis et al, 1992). Ένας δείκτης του οξειδωτικού στρες είναι η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η οποία αποτελεί το ενζυμικό κλειδί στην απομακρυνση των επικυνδυνών, ελευθέρων ριζών του οξυγόνου.

Μελετώντας την ενεργότητα της SOD στους αναγεννομένους και μη πρωτοπλάστες, παρατηρείται αύξηση στους τελευταίους, η οποία συνεχίζεται κατά την διάρκεια της καλλιέργειας, πράγμα το οποίο αποτελεί ένδειξη της παρουσίας οξειδωτικού στρες. Για να γίνει η ένδειξη βεβαιότητα απαιτείται περισσότερη έρευνα, όπως συσχέτιση της ενεργότητας της SOD με κάποιο αποτέλεσμα της παρουσίας του οξειδωτικού στρες και ένα τέτοιο είναι η υπεροξείδωση των μεμβρανικών λιπιδίων (Bowler et al, 1992), καθώς και η άμεση μέτρηση των ελευθέρων ριζών του οξυγόνου. Ακόμα, αφού πιστοποιηθεί η ύπαρξη του οξειδωτικού στρες, η χρήση αντιοξειδωτικών μέσων (για παράδειγμα ασκορβικού οξέος), θα αποτελούσε εργαλείο, τόσο για την επιβεβαίωση του προηγούμενου, όσο και για την μελέτη της επίδρασης τους στην αναστροφή του φαινομένου.

Ένα άλλο ενδιαφέρον σημείο, θα ήταν η μελέτη της MnSOD, του μιτοχονδριακού, δηλαδή ισοενζύμου, έτσι ώστε να ανιχνευτεί η έκταση της οξειδωτικής επίδρασης στα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Τέλος, μια αναλυτική μελέτη του χρόνου επαγωγής της SOD κατά την διάρκεια της ενζυμικής πέψης, όσον αφορά επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης, θα ήταν χρήσιμη για την συνέχιση της έρευνας στο επίπεδο του μηχανισμού ρύθμισης του ενζύμου.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το κύτταρο ανταποκρίνεται στις περιβαλλοντικές πιέσεις αλλάζοντας εκλεκτικά την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, συμπεραίνεται ότι υπάρχουν ειδικά μνημάτα για καθένα από αυτά τα γονίδια. Βεβαίως, το μονοπάτι από κάθε τέτοιο σήμα μέχρι την ειδική αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση, είναι πολύπλοκο, εμπλεκοντας κυτταρικά γεγονότα και ρυθμιστικές λειτουργίες (Scandalios, 1986). Όσο αφορά την SOD, είναι γνωστό ότι αυτή επαγεται από μια ποικιλία συνθηκών πίεσης, φαίνεται όμως ότι η επίδραση μιας ειδικής συνθήκης εξαρτάται από το υποκυτταρικό διαμέρισμα, στο οποίο δημιουργείται το οξειδωτικό στρες (Bowler et al, 1992). Το ζητούμενο πλέον, είναι οι παράγοντες που μεσολαβούν ανάμεσα στην γέννηση του οξειδωτικού στρες και την εμφάνιση των αντιστοιχών γονιδιακών προϊόντων.

Η σουπεροξειδική ρίζα και/ή το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν φαίνεται να εμπλεκονται στο μονοπάτι μεταφοράς του μνημάτος, αφού η κοινή τους παρουσία δεν επιτρέπει το διαχωρισμένο πρότυπο της SOD που παρατηρείται.

Η αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταγραφικής ρύθμισης, εμπλοκής ρυθμιστικών γονιδίων, ή μεταφραστικής ρύθμισης. Από ότι

φαινεται η αλλαγη πραγματοποιειται στο μεταγραφικο επιπεδο (Bowler et al,1989), πιθανοτατα με την εμπλοκη καποιων μεταγραφικων παραγοντων. Για παραδειγμα, ο μεταγραφικος ενεργοποιητης OxyR των γονιδιων που επαγονται απο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο *S. typhimurium*, ενεργοποιειται αμεσα με οξειδωση, οποτε ειναι ταυτοχρονα ο αποδεκτης και ο μεταφορεας του μνηματος του οξειδωτικου στρες (Storz et al, 1990).

Ο τροπος που ενας μεταγραφικος παραγοντας μπορει να ενεργοποιηθει ειναι διαφοροι, οπως η αλλαγη του επιπεδου φωσφορυλιωσης του απο ενα εξωγενες ερεθισμα, οποτε η επιτρεπεται η μεταβαση του στον πυρηνα η ρυθμιζεται η ενεργοτητα του για δεσμευση του DNA και εναρξη της μεταγραφικης ενεργοτητας (Hunter & Karin, 1992).Τετοιο παραδειγμα αποτελει ο ευκαρυωτικος μεταγραφικος παραγοντας NF-κB, ο οποιος ενεργοποιειται απο μια σειρα εξωγενων ερεθισματων, συμπεριλαμβανομενου και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schmitz, 1991).

Το ερωτημα που τιθεται τωρα ειναι πως ενας απλος μεταγραφικος παραγοντας μπορει να ευθυνεται για την πολυπλοκη ρυθμιση της SOD. Η ειδικη ρυθμιση μπορει να ειναι αποτελεσμα της παραγωγης ειδικων για καθε υποκυτταριο χωρο, μνηματων τα οποια να ειναι ταυτοχρονα αποδεκτες και μεταφορες του ερεθισματος. Τετοια μνηματα θα μπορουσαν να μεταφερονται απο το υποκυτταριο διαμερισμα στον πυρηνα, αρκετα γρηγορα, και ειδικα, να ενεργοποιουν το αντιστοιχο γονιδιο η τα ρυθμιστικα ενδιαμεσα γονιδια.Τετοιο ρολο θα μπορουσαν να εχουν τα λιπαρα οξεα για παραδειγμα, τα οποια ελευθερωνονται κατα το οξειδωτικο στρες, απο την πλασματικη μεμβρανη, τους χλωροπλαστες και τα μιτοχονδρια (Bowler et al, 1992) η οι αλλορμονες (αδενυλιωμενα νουκλεοτιδια που επαγονται απο θερμοκρασιακο και οξειδωτικο στρες), συσχετιση, ομως, της λειτουργιας τους με επαγωγή γονιδιακης εκφρασης, δεν εχει επιτευχθει (Lee et al, 1983).

Η ταυτοποιηση του μηχανισμου ρυθμισης και του ρολου της SOD στην κυτταρικη λειτουργια απαιτουν περισσοτερη και εις βαθος , βιοχημικη,φυσιολογικη και μοριακη αναλυση.Ετσι, και αν υπαρχει ικανη συσχετιση του οξειδωτικου στρες με την ανικανοτητα αναγεννησης των πρωτοπλαστων, και τελικα των ειδων, η SOD θα μπορουσε να ειναι ενα εργαλειο χρησιμο στην Βιοτεχνολογια για την δημιουργια φυτικων ειδων ικανων να ανταπεξελθουν στην πιεση αυτη.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Alscher R.G. (1989): Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant.* 77:457-464.
- Baum J.A., Scandalios J.G (1982): Multiple genes controlling superoxide dismutase expression in maize. *J.Hered.* 73:95-100.
- Bergounioux C., Perennes C., Brown S.C., Cadal P.(1988): Cytometric analysis of growth-regulator-dependent transcription and cell cycle progression in *Petunia* protoplast cultures. *Planta* 175:500-505.
- Binding H. (1975): Reproducibly high plating efficiencies of isolated mesophyll protoplasts from shoot cultures of tobacco. *Physiol. Plant.* 35:225-227.
- Bowler C., Alliotte T., De Loose M., Van Montagu M., Inze' D. (1989): The induction of manganese superoxide in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J.* 8(1):31-38.
- Bowler C., Van Montagu M., Inze' D.(1992): Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83-116.
- Bueno P., Del Rio L.A. (1992): Purification and properties of glyoxysomal cuprozinic superoxide dismutase from watermelon cotyledons (*Citrullus vulgaris* schrad). *Plant Physiol.* 98:331-336.
- Cocking E.C. (1961): Properties of isolated protoplasts. *Nature* 191:780-782.
- Criqui M.C., Durr A., Parmentier J., Marbach J., Fleck J., Jamet E. (1992): How are photosynthetic genes repressed in freshly-isolated mesophyll protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.Biochem.*, in press.
- Davis B.J. (1964): Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.*121:404-427.
- Draetta G., Beach D. (1988): Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependant phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 54: 17-26.
- Draetta G., Luca F., Westendorf J., Brizuela L., Ruderman J., Beach D.(1989): cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 56:829-838.
- Elstner E.F. (1982): Oxygen activation and oxygen toxicity.*Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:73-96.

- Ferreira P.C.G., Hemerly A.S., Villarroel R., Van Montage M., Inze' D. (1991): The Arabidopsis Functional homolog of the p34cdc2 protein kinase. *Plant Cell* 3:531-540.
- Fischer R., Behnke S., Apel C. (1989): The effect of chemical stress on the polypeptide composition of the intracellular fluid of barley leaves. *Planta* 178:61-68.
- Fleck J., Durr A., Lett M.C., Hirth L. (1979): Changes in protein synthesis during the initial stage of life of tobacco protoplasts. *Planta* 145:278-285.
- Flengsrud R., Kobro G. (1989): A method for two-dimensional electrophoresis of proteins of green plant tissues. *Anal. Biochem.* 177:33-36.
- Fridovich I. (1986): Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 246:1-11.
- Grosset J., Marty I., Chartier Y., Meyer Y. (1990): mRNAs newly synthesized by tobacco mesophyll protoplasts are wound- inducible. *Plant Mol. Biol.* 15:485-496.
- Grosset J., Meyer Y., Chartier Y., Kauffmann S., Legrand M., Fritting B. (1990): Tobacco mesophyll protoplasts synthesize 1,3-glucanase, chitinases, and osmotins during in vitro culture. *Plant Physiol.* 92:520-527.
- Hadwiger J.A., Wittenberg G., Richardson H.E., De Barros Lopes M., Reed S.I. (1989): A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6255-6259.
- Hahne E. Fleck J., Hahne G. (1989): Colony formation from mesophyll protoplasts of a cereal, oat. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6157-6160.
- Hartwell L.H., Weinert T.A. (1989): Checkpoints: control that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-634.
- Hartwell L.H. (1991): Twenty-five years of cell cycle genetics. *Genetics* 129:975-980.
- Hassan H.M., Fridovich I. (1978): Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in E.coli. *J. Biol. Chem.* 253(22):8143-8148.
- Hemerly A., Bergounioux C., Van Montagu M., Inze' D., Ferreira P. (1992): Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3295-3299.
- Herburn A.G., Belanger F.C., Mattheis J.R. (1987): DNA methylation in plants. *Dev. Genet.* 8:475-493.

- Hunter T., Karin M. (1992): The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70:375-387.
- Inze' D., Ferreira P., Hemerly A., Segers G., De Veylder L., Engler J., Engler G., Van Montagu M. (1992): The molecular basis of cell cycle control in *Arabidopsis thaliana*. In: *Morphogenesis in plants: Molecular approaches*, Roubelakis-Angelakis K.A., Tran Thanh Van K., eds, Plenum Publ Co, New York.
- Jacobs T. (1992): Control of cell cycle. *Dev. Biol.* 153:1-15. Jung G., Wernicke W. (1993): Cell cycle in potentially dedifferentiating cereal mesophyll protoplasts cultured in vitro. I.Abnormalities in cycle kinetics. *J. Plant Physiol.* 141:444-449.
- Jung G., Hahne B., Wernicke W. (1993): Cell cycle in potentially dedifferentiating cereal mesophyll protoplasts cultured in vitro. II.Behavior of the cytoskeleton. *J. Plant Physiol.* 141:428-435.
- Katsirdakis K.C., Roubelakis-Angelakiw K.a. (1992a): Modified culture conditions for increased viability and cell wall synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. sultanina) leaf protoplasts. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 28:255-260.
- Katsirdakis K.C., Roubelakis-Angelakiw K.a. (1992b): Ultrastructural and biochemical aspects of cell wall regeneration in recalcitrant and regenerating leaf protoplasts. *In vitro Cell Dev. Biol.* 28:90-97.
- Kelly T.J., Martin G.S., Forsburg S.L., Stephen R.J., Russo A., Nurse P. (1993): The fission yeast *cdc18+* gene product couples S phase to START and mitosis. *Cell* 74:371-382.
- Kodama H., Nawakami N., Watanabe A., Komamine A. (1989): Phase-specific polypeptides and poly(A)<sup>+</sup> RNAs during the cell cycle in synchronous cultures of *Catharanthus roseus* cells. *Plant Physiol.* 89:910-917.
- Koop H.V., Schweiger H.G. (1985): Regeneration of plants from individually cultivated protoplasts using an improved microculture system. *J. Plant Physiol.* 121:245-257.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lett M.C., Fleck J., Fritsch C., Durr A., Hirth L. (1980): Suitable conditions for characterization, identification and isolation of the mRNA of the small subunit

- of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase from *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 148:211-216.
- Lee P.C., Bachner B.R., Ames B.N. (1983): AppppA, heat-shock stress, and cell oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7496-7500.
- Loudon P.T., Nelson R.S., Ingram D.S. (1989): Studies of protoplast culture and plant regeneration from commercial and rapid-cycling Brassica species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 19:213-224.
- Loulakakis K.A., Roubelakis-Angelakis K.A. (1990): Immunocharacterization of NADH-glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol.* 94:109-113.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951): Protein measurment with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Matters G.L., Scandalios J.G. (1986): Changes in plant gene expression during stress. *Dev. Biol. &:*167-175.
- Matters G.L., Scandalios J.G. (1986): Effect of the free radical-generating herbicide paraquat on the expression of the superoxide dismutase genes of maize. *Bioch. Bioph.acta* 882:29-38.
- Matters G.L., Scandalios J.G. (1987): Synthesis of isozymes of superoxide dismutase in maize leaves in response to O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> and elevated O<sub>2</sub>. *J. Exp. Bot.* 38(190):842-852.
- Mehta R., Parsons B.L., Mehta A.M., Nakhasi H.L., Mattoo A.K. (1991): Differential protein metabolism and gene expression in tomato fruit during wounding stress. *Plant Cell Physiol.* 32(7):1057-1065.
- Meyer Y., Aspart L., Chartier Y. (1984): Auxin-induced regulation of protein synthesis in tobacco mesophyl protoplasts cultivated in vitro. I.Characteristics of auxin-sensitive proteins. *Plant Physiol.* 75:1027-1033.
- Meyer Y., Aspart L., Chartier Y. (1984): Auxin-induced regulation of protein synthesis in tobacco mesophyl protoplasts cultivated in vitro. II.Time course and level of auxin control. *Plant Physiol.* 75:1034-1039.
- Meyer Y., Chartier Y. (1981): Hormonal control of mitotic development in tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* 68:1273-1278.
- Meyer Y., Chartier Y., Grosset J., Marty I., Brugidou G., Marihno P., Rivera R. (1992): Gene expression in mesophyll protoplasts. In: *Morphogenesis in*

- plants: Molecular approaches, Roubelakis-Angelakis K.A., Tran Thanh Van K., eds, Plenum Publ Co, New York.
- Millar J.B.A., Russel P. (1992): The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* 68:407-410. Monk L.s., Fagerstedt K.V., Crawford M.M. (1989): Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol. Plant.* 76:456-459.
- Moreno S., Hayles J., Nurse P. (1989): Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell* 58:361-372. Nagata T., Takebe I. (1970): Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92:301-308.
- Nitschke K., Fleig U., Schell J., Palme K. (1992): Complementation of the cs dis2-11 cell cycle mutant of *S. Pombe* by a protein phosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 11:1327-1333.
- Norbury C., Nurse P. (1992): Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 61:441-470.
- Ochatt S.J. (1991): Strategies for plant regeneration from mesophyll protoplasts of recalcitrant fruit and farmwoodland species *Prunus avium* L. (sweet/wild cherry), Rosaceae. *J. Plant Physiol.* 139:155-160.
- Ohnishi N., Kodoma H., Ando S., Komamine A. (1990): Synthesis of protein and mRNA is necessary for transition of suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells from G1 to S phase of cell cycle. *Physiol Plant.* 80:95-101.
- Potrykus I., Shillito R.D. (1986): Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration. *Methods Enzymology* 118:549-578.
- Power J.B., Drey M.R., Freeman J.R., Mulligan B.J., Cocking E.C. (1986): Fusion and transformation of plant protoplasts. *Methods Enzymology* 118:578-649.
- Premecz G., Ruzicska P., Ola'h T., Farkas G.L. (1978): Effects of "osmotic stress" on protein and nucleic acid synthesis in isolated tobacco protoplasts. *Planta* 141:33-36.
- Puite K.J. (1992): Progression in plant protoplast research. *Physiol. Plant.* 85:403-410.
- Roubelakis-Angelakis K.A. (1992): An assessment of possible factors contributing to recalcitrance of plant protoplasts. In: *Morphogenesis in plants: Molecular approaches*, Roubelakis-Angelakis K.A., Tran Thanh Van K., eds, Plenum Publ Co, New York.



- Scandalios J.G.(1990): Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv. Genet.* 28:1-41.
- Scandalios J.G (1993): Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101-7-12.
- Siminis C.I., Kanellis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A. (1990): De novo protein synthesis in tobacco and grapevine protoplasts during culture. *Physiol. Plant.* 79:483.
- Siminis C.I., Kanellis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A. (1992): Catalase is differentially expressed in regenerating and recalcitrant protoplasts during isolation and culture. *Physiol. Plant.* 85:A95.
- Siminis C.I., Kanellis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A. (1993): Differences in protein synthesis and peroxidase isoenzymes between recalcitrant and regenerating protoplasts. *Physiol. Plant.* 87:263-270.
- Smith I.K., Vierheller T.L., Thorne C.A. (1989): Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiol. Plant.* 77:449-456.
- Storz G., Tartaglia L.A., Ames B.N. (1990): Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248:189-194.
- Takahashi Y., Kuroda H., Tanaka T., Machida Y., Takebe I., Nagata T. (1989): Isolation of an auxin-regulated gene cDNA expressed during the transition from Go to S phase in tobacco mesophyll protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9279-9283.
- Takahashi Y., Nagata T. (1992): Expression of an auxin- regulated gene, parC and a novel related gene, C-7, from tobacco mesophyll protoplasts in response to external stimuli and in plant tissues. *Plant Cell Physiol.* 33(6):779-787.
- Theodoropoulos P.A., Roubelakis-Angelakis K.A. (1989): Mechanism of arginine transport in *Vitis vinifera* L. protoplasts. *J. Exp. Bot.* 40(220):1223-1230.
- Theodoropoulos P.A., Roubelakis-Angelakis K.A. (1991): Glucose transport in *Vitis vinifera* L. protoplasts. *J. Exp. Bot.* 42(237):477-483.
- Tsang E.W.T., Bowler C., Herouart D., Van Camp W., Villarroel R., Genetello C., Van Montagu M., Inze' D. (1991): Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3:783-792.
- Vasil I.K. (1988): Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Biotechnology* 6:397-409.

- Uchimiya H., Murashige T. (1976): Influence of the nutrient medium on the recovery of dividing cells from tobacco protoplasts. *Plant Physiol.* 57:424-429.
- Wang H., Culter A.J., Saleem M., Fowke L.C. (1989): DNA replication in maize leaf protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18:33-46.